

200837013A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究


平成 20 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 21 (2009) 年 4 月

平成 21年 4月 10日

厚生労働大臣殿

住 所 〒152-0021 東京都目黒区東が丘1-22-3-103  
フリカ ナ イトオ  
研究者 氏 名 今井 俊夫   
(所属機関) 国立がんセンター研究所

平成 20年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) :

食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究(H18-食品一般-013)

国庫補助金精算所要額 : 金 13,000,000円也(うち間接経費 0円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況  
(総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入した。)
7. 健康危険情報  
(総括研究報告書の中に、書式に従って記入した。)

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成21(2009)年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究 -----		1
今井俊夫		
II. 分担研究報告		
1. ライフステージによるアクリルアミドの体内動態の特性 -----		12
紅林秀雄		
2. ライフステージによるアクリルアミドの神経毒性及び精巢毒性の病理解析 ----		31
渋谷 淳		
3. ライフステージによるアクリルアミドの発がん感受性に関する研究 -----		42
今井俊夫		
4. ライフステージを勘案したアクリルアミドの遺伝毒性誘発機構の解析 -----		60
本間正充		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----		68
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----		
1. Pathological assessment of the nervous and male reproductive systems of rat offspring exposed maternally to acrylamide during the gestation and lactation periods - a preliminary study.		
2. Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods.		

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成 20 年度 総括研究報告書

食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究

主任研究者 今井 俊夫 国立がんセンター研究所 実験動物管理室 室長

## 研究要旨

食品からのアクリルアミド (AA) の摂取量は、成人よりも小児の方が多いと推定されている。本研究では、動物の胎児、乳幼児～春機発動期における AA の体内動態及び毒性を成熟期と比較検討し、小児を含むヒトに対するリスク管理に資するデータを構築する。20 年度、AA の体内動態の特性については、[紅林] 4 及び 14 週齢の SD 雌ラットに [2, 3-<sup>14</sup>C]AA を 0.5 mg/kg 体重の用量で 1 回強制経口投与した結果、72 時間後までの尿中排泄及び総回収率は、幼若ラットでは 69 及び 85%、成熟ラットでは 63 及び 73% であり、AA の代謝、排泄は成熟ラットに比し幼若ラットで速いことが推察された。精巣、神経毒性に関しては、[渋谷] 生後 3 及び 7 週齢の SD 雄ラットに AA を 50、100、200 ppm の用量で 4 週間飲水投与した結果、神経毒性に関しては、幼若期と成熟期の感受性差は乏しいと考えられたが、精巣毒性については幼若期の方が高い感受性を示すことが明らかとなった。発がん性に関しては、[今井] F344 ラットの乳幼児期に AA を 20、40、80 ppm の用量で飲水投与することにより、その後に投与する *N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素誘発性発がんに対する相加作用があるか否かを検討した結果、各群において AA の標的臓器である甲状腺、乳腺及び精巣鞘膜を含む諸臓器、組織に前がん病変あるいは腫瘍の発生がみられたが、それらの発生率に群間の明らかな差は認められなかった。遺伝毒性に関しては、[本間] 3 及び 11 週齢の *gpt delta* 雄ラットあるいは SD 雄ラットに AA を 20、40、80 あるいは 50、100、200 ppm の用量で 4 週間飲水投与した結果、幼若期投与ラットの精巣において、成熟期投与ラットの 5 倍以上の DNA 付加体の蓄積がみられ、コメット試験、小核試験、遺伝子突然変異解析でも幼若ラットの高感受性を示す結果が得られた。検索した他の臓器、組織では成熟、幼若ラットの違いはみられなかった。以上、AA の幼若期投与による体内動態、神経毒性及び発がん性について、成熟動物に比して幼若動物の感受性が高いことを示唆する結果は得られなかったが、精巣毒性および精巣における遺伝毒性については幼若期に高感受性であり、DNA 付加体が精巣毒性に関与している可能性が示された。

## 分担研究者

- 1) 紅林 秀雄 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長
- 2) 渋谷 淳 東京農工大学大学院・共生科学技術研究院・動物生命科学部門・准教授
- 3) 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長

## A. 研究目的

食品に含まれる遺伝毒性発がん物質に対するリスク管理措置を検討する一般原則として、これまでは主に ALARA の原則が採用されてきた。しかし、種々の汚染物質を対象とするリスク管理活動において、優先順位を決めるための勧告としては十分ではなかった。

そこで、ヒトの推定摂取量と発がん性の強さを比較した数値がより役立つとの観点より、2005年2月のJECFAにおいて、リスク管理の優先度を示す値として暴露マージンを採用することとされた。食品の調理過程においてアクリルアミド(AA)、ヘテロサイクリックアミンなど遺伝毒性発がん物質の生成することが報告されているが、JECFAでは特にAAに関し、一般成人の平均推定摂取量として1 µg/kg体重/日、小児など高摂取群については4 µg/kg体重/日であること、動物の発がん性試験データとの対比により、その暴露マージンは300-75と比較的小さいことから、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性が否定できず、今後も食品中のAA濃度を低減するための努力をすべきであると結論された。我が国においても加工食品中のAA濃度に関する実態調査及び調理過程で生成されるAAの低減法について取組みが行われてきた。

AAは、実験的に神経毒性、精巣毒性、遺伝毒性及び発がん性を示すことが知られ、中でも遺伝毒性を伴う発がん性のヒトへのリスクが懸念される。しかしながら、AAの職業暴露に対するリスク評価を主な目的とした実験データは多数報告されているものの、食品からの暴露を想定した毒性データは十分ではない。そこで、米国を中心にAAあるいはその代謝物で生体内活性の高いグリシドアミド(GA)の発がん性試験及び発達期神経毒性試験により、低用量長期間投与による毒性評価を目的とした研究が行われており、それらの結果が明らかにされた際に再度リスク評価をすべきであるとされている。

一方、現時点におけるAAの実験的毒性研究のもう一つの課題として、動物モデルとして主に成熟ラットなどを用いた研究結果を中心に報告され、胎児、乳幼児期あるいは春機発動期におけるデータの極めて少ないこ

とが挙げられる。胎児、乳幼児期の動物は化学物質の代謝様式や臓器組織の発育速度、成熟度のみならず、臓器への血流量や血液-脳関門の機能など生理的な違いにより化学物質に対する毒性反応も成熟動物と異なる可能性がある。特にAAに関しては、小児は高摂取群であり(JECFA, 2005; Dybing Eら、2005)、また母親から胎児へ胎盤移行する可能性も示されていることから(Sorgel Fら、2002; Schettgen Tら、2004)、胎児期を含む小児への投与による毒性の比較評価を早急に実施することが重要である。

そこで本研究では、胎児期、幼若期、春機発動期、成熟期など各ライフステージにおけるAAの体内動態を成熟期と比較するとともに、AAの当該期暴露による神経毒性、精巣毒性、発がん性及び遺伝毒性の特性及び感受性の成熟期暴露との違いについて実験的に明らかにする。特に用量反応性を考慮した検索を行うことにより、AAの高摂取群とされる小児を含むヒトに対するリスク管理に資する情報を得ることが可能となる。

## B. 研究方法

### (1) ライフステージによるAAの体内動態の特性 [紅林]

4週齢及び14週齢のSD雌ラット各4匹に[2,3-<sup>14</sup>C]AA(比放射能4-5 mCi/mmol)を0.5 mg(35 µCi)/kg体重の用量で1回強制経口投与した。乳児を伴う14週齢のSD哺乳ラット2匹には、0.5及び2.5 mg/kg体重の用量で1回強制経口投与した。血液及び血漿中の放射能濃度を測定するため、AA投与10、30分、1、6、24及び72時間後に心採血を行った。測定には液体シンチレーションカウンター(LSC1000、ALOKA)を用いた。また、尿、糞、呼気中放射能排泄率及び体内放射能残存率を測定するため、AA投与後に動物を呼気回

収装置のついたガラス製代謝ケージに収容し、所定区間毎の呼吸を捕集すると同時に尿および糞を分別採取した。呼吸中の二酸化炭素は捕集液（モノエタノールアミン、プロピレングリコール、メタノールを等量混合）に吸収させ、その一部を採集して放射能を測定した。尿及び糞は均一化した後、一部を正確に秤取して放射能を計測した。全身オートラジオグラフィは、AA 投与 72 時間後のラットについて、バイオイメージングアナライザー（BAS2000、富士写真フィルム）の PSL 値から半定量的黒化度として測定し、高濃度、中濃度、低濃度及び極低濃度の 4 段階に分けて評価した。乳汁中放射能濃度測定は、哺乳ラットに [2, 3-<sup>14</sup>C]AA を 1 回強制経口投与後、所定の観察時間後に授乳中の児動物を安楽死させ、胃内容物を採取して、放射能濃度を計測した。

(2) ライフステージによる AA の神経毒性及び精巣毒性の病理解析 [渋谷]

幼若期投与群として、妊娠 10 日目の SD:IGS 雌ラット 13 匹を購入し、生後 21 日齢の雄児動物 40 匹を実験に供した。また、成熟期投与群として、6 週齢の SD:IGS 雄ラット 40 匹を購入し、1 週間馴化した。幼若期投与群では生後 21 日、成熟期投与群では 7 週齢に、各群 10 匹ずつ 4 群に分け、AA を 0（対照）、50、100、200 ppm 濃度で 4 週間飲水投与した。AA の投与濃度は、成熟雄ラットにおいて、飲水投与により 4 週間以内に神経および精巣障害を生じることが知られている 200 ppm を最高用量とした (Lee et al., Arch. Toxicol., 2005)。週 1 回体重、摂餌量および摂水量を測定し、臨床症状の観察を行った。神経症状については、各個体について姿勢などを観察し、スコア化した。剖検時には脳、三叉神経、坐骨神経、精巣、精巣上体を採取し、脳、精巣、精巣上体の重量を測定した。脳はメタカーン固定液（4℃、一晚）、精巣はブアン固定液（室

温、一晚）にて固定し、精巣上体、三叉神経は 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定した。それぞれ常法に従ってパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施した。坐骨神経は摘出前に 2.5%グルタルアルデヒドの点滴固定を行った後採取し、エポン包埋後、1 μm 切片を作成し、トルイジンブルー染色を行った。小脳については、synaptophysin (SYP) に対する免疫染色を実施し、坐骨神経および小脳分子層に関しては、デジタルカメラ付顕微鏡により各個体 1 枚の組織写真を撮影し、形態計測を行った。坐骨神経においては、400 倍視野で撮影した画像について、変性軸索の割合、神経線維密度、萎縮した有髄神経線維（径 < 3 μm）の割合を計測した。小脳分子層においては、12.5 倍視野で撮影した画像上で小脳皮質の長さを求めた後、同じ範囲について顕微鏡下で SYP 陽性の異常な点状染色像の個数を計測し、皮質の長さ（mm）に対する点状染色像の数を算出した。精巣は、各個体片側一断面について円形に切れている精細管を 400~650 個観察し、病変の認められた精細管の割合を算出した。

(3) ライフステージによる AA の発がん感受性に関する研究 [今井]

妊娠 F344 ラット 36 匹を各群 6 匹の第 1 群～第 6 群に分けた。出生後の児動物は、原則として雌雄各群 24 匹に揃えたが、第 6 群については母動物 6 匹中 1 匹の出産児数が 1 匹で、児動物の発育も不良であったことから除外したため、雌雄各 20 匹となった。第 1 群～第 4 群の母動物には、出産直後より 3 週後の離乳まで、AA を 0（対照）、20、40 及び 80 ppm 濃度で飲料水に混じて自由摂取させた。第 5 群及び第 6 群については実験途中より抗甲状腺剤処置を行うサテライト群として AA を 0（対照）及び 40 ppm 濃度で投与した。AA の投与量は、乳幼児～春機発動期投与の予備実験で

一般状態、体重、摂餌量及び摂水量に顕著な影響のみられなかった 20 及び 40 ppm に加え、より高い用量として 80 ppm を設定した。離乳後、母動物はエーテル麻酔下で安楽殺した。離乳後の各群の児動物には母動物と同様の方法で AA を 3 週間投与し、その 1 週後の 7 週齢時に発がん物質処置として肝臓、腎臓、肺及び甲状腺、乳腺などの多臓器に発がん標的性を示す *N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素 (MNU) を第 1 群～第 6 群の雌雄の児動物に 40 mg/kg 体重の用量で 1 回腹腔内投与した。第 5 群、第 6 群の雌雄には、8 週齢時以降、抗甲状腺剤のスルファジメトキシシン (SDM) を 125 ppm 濃度で飲水投与した。実験期間中、一般状態は毎日観察し、体重及び摂餌量は生後 20 週齢までは週 1 回、その後は 4 週間に 1 回測定した。また、MNU 投与後は触診により皮下結節/腫瘍の発生状況を週 1 回観察してノギスにてその大きさ(たて×よこ×高さ)を測定した。50 週齢時に実験を終了し、エーテル深麻酔下にて動物を放血殺した。剖検時、雌については剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察して大きさを測定するとともに、雌雄について肝臓、腎臓、肺、脾臓、胸腺、リンパ節、甲状腺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、脳、乳腺、膀胱及び肉眼的異常部位を摘出した。摘出臓器、組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従い HE 染色標本作製、病理組織学的解析を実施した。

(4) 生体内代謝機構を考慮した AA 遺伝毒性抑制物質の探索 [本間]

幼若期投与群として、*gpt delta* トランスジェニック F344 妊娠ラットを購入し、生後 21 日齢の雄児動物 20 匹を実験に供した。また、成熟期投与群として、11 週齢の *gpt delta* トランスジェニック雄ラット 20 匹を用いた。幼若および成熟ラットを各群 5 匹の 4 群に分け、AA を 0 (対照)、20、40、80 ppm 濃度で飲料

水に混じて 4 週間自由摂取させた。小核試験については、投与開始 2 日及び 4 週後 (最終投与日) に、動物の尾静脈または心臓から血液を約 100  $\mu$ L 採取するとともに、最終投与日には剖検して精巣を摘出した。小核試験は Hayashi らの方法に従って行った。アルカリコメット試験については、最終投与日に肝臓の外側左葉の一部及び胃を採取して実施した。JaCVAM コメット試験共同研究のプロトコールに従った。遺伝子突然変異試験については、アルカリコメット試験用のサンプルを採取後、肝臓及び精巣の一部を採取して DNA を抽出し試料とした。*gpt* 遺伝子試験は Masumura らの方法に従って行った。その他、肝臓、精巣、甲状腺、乳腺の一部から DNA を抽出し、DNA 付加体検出用の試料とした。また、肝臓、精巣の一部から組織標本作製し、病理組織学的検索を行った。

また、SD 雄ラットを 3 週齢 (幼若) 及び 11 週齢 (成熟) 時に各群 10 匹の 4 群に分け、AA を 0 (対照)、50、100、200 ppm 濃度で飲料水に混じて 4 週間自由摂取させた。小核試験については最終投与日に、動物の尾静脈または心臓から血液を約 100  $\mu$ L 採取するとともに、剖検して精巣を摘出した。アルカリコメット試験については、肝臓の外側左葉の一部及び胃を採取して実施した。DNA 付加体の定量として、AA による主たる DNA 付加体である *N*-GA-Gua を LC/MS/MS により測定した。

*N*-GA-Gua およびその安定同位体は Gamboa da Costa らの方法に従い合成した。LC/MS/MS は Waters-Micromass 社の Quattro Ultima Pt を使い、HPLC のカラムは Shim-pack XR-ODS (75 $\times$ 3.0mm) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験では、使用する動物数は最小限に留めた。投与実験は飲水による経口投与が主体であり、また動物は全てエ



一テル深麻酔下で大動脈ないし心臓からの脱血により屠殺し、その他の実験手技、方法についても動物の愛護に十分配慮して行った。実験の開始に当っては、「国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規定」あるいは「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験（倫理）委員会に計画書を提出して実施承認を得た。

### C. 研究結果

#### (1) ライフステージによる AA の体内動態の特性 [紅林]

[2, 3-<sup>14</sup>C]AA を 0.5 mg/kg で経口投与した幼若及び成熟ラットの血液中放射能濃度は全ての時点で高い濃度を示し、幼若ラットは投与 1 時間後、成熟ラットは 6 時間後に最高数値に達し、その後 72 時間後でも高濃度を保ち続けた。一方、血漿では速かに減少した。尿・糞・呼気中放射能排泄率については、幼若ラットでは投与 72 時間後までに尿中に 69.3%、糞中に 8.4%、呼気中に約 7.5% の排泄率が認められ、総回収率は 85.2% であった。呼気中には投与後 3 時間までに 1.7% が排泄され、24 時間までには 5.1% が排泄された。成熟ラットでは、投与後 72 時間までに尿中に 63.0%、糞中に 7.1%、呼気中に約 3.1% の排泄率が認められ、総回収率は 73.2% であった。呼気中排泄率については、成熟ラットに比し幼若ラットにおいて高い傾向が見られた。全身オートラジオグラフィでは、投与後 72 時間の幼若ラットおよび成熟ラットのいずれも血液中濃度は高く、次いで眼球、肝臓、肺、腎臓、皮膚、脾臓に高濃度検出されたが、甲状腺、乳腺などへの集積性は認められなかった。[2, 3-<sup>14</sup>C]AA を 0.5 及び 2.5 mg/kg の用量で単回経口投与後の授乳中ラットから児ラットへの移行性を検討した結果、乳汁中放射能濃

度は、投与後 30 分でも低濃度存在し投与後 6 時間で最高値を示し、その後ゆっくり減少した。

#### (2) ライフステージによる AA の神経毒性及び精巣毒性の病理解析 [渋谷]

幼若期投与群では、100 ppm 以上で体重増加抑制がみられたが、成熟期投与群では体重に群間差は認められなかった。幼若ラットでは、200 ppm で摂餌量の減少がみられ、摂水量は両群とも 200 ppm で低値を示した。AA の体重当たり平均摂取量は、いずれの用量群でも、成熟ラットよりも幼若ラットの方が高値であった。臨床観察では、両群で歩行異常が観察され、症状の進行および程度は用量に相関していた。幼若ラットの方が、成熟ラットよりもその出現時期及び症状の進行が早い傾向がみられた。幼若期投与群の 100 ppm 以上で脳、200 ppm で精巣、50 及び 200 ppm で精巣上体の絶対重量が減少し、200 ppm で脳相対重量が増加した。成熟期投与群では、200 ppm 群で精巣上体の絶対重量が低値を示した。

神経系組織の病理組織学的検索および形態計測において、幼若期、成熟期のいずれも 100 ppm 以上で、三叉神経節細胞の中心性色質融解が明らかであった。両群とも、100 ppm 以上で坐骨神経における変性軸索の割合が、200 ppm で小脳分子層における SYP 陽性点状染色像の個数が高値を示した。高用量群では成熟ラットに比べ幼若ラットの方が、中心性色質融解の程度や変性軸索の割合、SYP 陽性点状染色像の個数の値が大きく、神経障害の程度が強い傾向がみられた。

精巣の病理組織学的観察では、幼若期投与群において、精子細胞の変性、円形あるいは伸長精子細胞の減少、消失が 100 ppm 以上で明らかで、精上皮の高度脱落により変性した精細管もみられた。また、性細胞の剥離や多核巨細胞の出現も散見された。精巣上体では

管腔内に脱落した性細胞が多数認められた。一方、成熟期投与群では、性細胞の剥離が 100 ppm 以上で増加したが、幼若ラットで認められた精子細胞の変性や消失は殆ど観察されなかった。セルトリ細胞の空胞化は、いずれの群においても散見され、その頻度に群間差は認められなかった。

神経毒性に関わるパラメーターとして、4 週時の歩行異常のスコア、坐骨神経における変性軸索の割合および小脳分子層における SYP 陽性点状染色像の個数と、体重当たりの AA 摂取量との関係を検討した結果、幼若期および成熟期投与群ともに、いずれのパラメーターも AA 摂取量に応じた増加を示した。精巢毒性に関わるパラメーターとして、セルトリ細胞空胞化以外の精上皮の障害を認めた精細管の割合と体重当たりの AA 摂取量との関係については、成熟ラットでは、障害を認めた精細管の割合は AA 摂取量の増加に対してわずかに増えたのみであったのに対し、幼若ラットでは著しい増加を示した。

(3) ライフステージによる AA の発がん感受性に関する研究 [今井]

母動物については、AA 投与による一般状態の変化はみられず、体重についても 80 ppm 群で低値傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。摂餌量及び摂水量は、80 ppm 群において低値傾向を示した。

児動物については、AA 投与に起因すると考えられる死亡及び一般状態の変化はみられず、実験期間中の死亡率の推移に群間の明らかな差は認められなかった。体重は生後 3 週目より実験期間を通し、雌雄の全ての AA 投与群において低値を示したが、摂餌量及び摂水量には AA 投与による明らかな影響はみられなかった。触診により経時的に観察、測定した皮下に形成された乳腺腫瘍の発現状況に関しても、AA 投与による明らかな影響はみられな

かった。臓器重量については、雌の 40 ppm 以上の群の腎臓相対重量の低値、80 ppm 群の肝臓相対重量の高値、SDM 投与群の雌雄における甲状腺相対重量の高値あるいは高値傾向などがみられた。病理組織学的検索では対照群に比し、雄の 0 ppm+SDM 群及び 40 ppm+SDM 群において甲状腺における濾胞上皮の巣状過形成、腺腫及び腺腫/腺癌の発生頻度が、雌の 0 ppm+SDM 群において巣状過形成、40 ppm+SDM 群において巣状過形成、腺腫及び腺腫/腺癌の発生頻度が増加した。SDM を投与しなかった雄の 80 ppm 群では、対照群に比し甲状腺の濾胞上皮の巣状過形成の発生頻度が増加傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。SDM を投与した群間の比較において、雄では AA 投与による影響はみられず、雌では 0 ppm+SDM 群に比し 40 ppm+SDM 群で腺腫及び腺腫/腺癌の増加傾向がみられたが、統計学的有意差はなかった。雄の 0 ppm+SDM 群において口腔における扁平上皮過形成の発生頻度が増加したが、40 ppm+SDM 群に影響はみられなかった。肺においては、雄の 20 及び 80 ppm 群で肺胞上皮過形成の発生頻度が低下したが、80 ppm 群では肺腺癌の発生頻度が増加した。雄の 0 ppm+SDM 群及び 40 ppm+SDM 群においては、肺胞上皮過形成の発生頻度が低下したが、腺腫、腺癌あるいは腺腫/腺癌の発生頻度は増加した。雌の 40 ppm+SDM 群において巣状の子宮腺過形成が増加したが、0 ppm+SDM 群との間に統計学的有意差はなかった。その他、AA の標的臓器を含む多臓器において種々の頻度で前がん病変あるいは腫瘍の発生が認められたが、AA あるいは SDM 投与による明らかな影響は認められなかった。

(4) 生体内代謝機構を考慮した AA 遺伝毒性抑制物質の探索 [本間]

*gpt delta* トランスジェニック F344 雄ラットを用いて多臓器、マルチエンドポイントの

遺伝毒性試験を行った結果、肝臓ではわずかであるがコメット試験による DNA 損傷が確認されたが、幼若動物と成熟動物での顕著な差は認められなかった。一方、骨髄での小核の誘発に関しては成熟ラットでは顕著な誘発は認められなかったが、幼若ラットのみにて最高用量で統計的に有意差が認められた。gpt 突然変異に関しては、成熟、幼若ラットにおいて AA による肝臓での突然変異の誘発性は認められず、また成熟、幼若の差も認められなかった。精巣に関しては幼若ラットの最高用量群で突然変異の誘発に有意差が認められた。DNA 付加体については、肝臓、甲状腺、乳腺、精巣について解析を行った結果、肝臓、乳腺、精巣で用量依存的な増加を観察した。乳腺では成熟、幼若ラットともに同程度の高い付加体の生成が観察された。肝臓、精巣では成熟、幼若ラットにとも用量依存的な増加を示し、さらに幼若、成熟ラットで差が観察された。特に、精巣においては幼若ラットで 5 倍以上の付加体の蓄積が観察された。

SD 雄ラットを用いた実験では、末梢血の小核は最高用量でわずかに増加したが、幼若、成熟ラットでの差は認められなかった。肝臓でのコメットも用量依存的に両群で増加したが、むしろ幼若ラットの方が増加率は低かった。一方、精巣に関しては小核、コメットともに幼若ラットでのみ用量依存的な反応性と有意な誘発を認めた。

#### D. 考察

(1) ライフステージによる AA の体内動態の特性 [紅林]

[2, 3-<sup>14</sup>C]AA を 0.5 mg/kg で経口投与した雌ラットの血液中放射能濃度は全ての時点で高い濃度を示し、幼若ラットは投与 1 時間後、成熟ラットは 6 時間後に最高値に達し、その後 72 時間後でも高濃度を保ち続けた。一方、

血漿では速かに減少することから、投与した [2, 3-<sup>14</sup>C]AA の放射能は血球成分に強く吸着されることが示された。尿・糞・呼気中放射能排泄率については、幼若ラットでは投与 72 時間後までに尿中に 69.3%、糞中に 8.4%、呼気中に約 7.5% の排泄率が認められ、総回収率は 85.2% であった。成熟ラットでは、投与後 72 時間までに尿中に 63.0%、糞中に 7.1%、呼気中に約 3.1% の排泄率が認められ、総回収率は 73.2% であった。何れにおいても高い尿中排泄率があり吸収率の良いことが確認されたが、成熟ラットに比べ幼若ラットでは総回収率が高い傾向が見られた。成熟ラットで回収率が低いのは、体外排泄ルートの複雑化に影響されていると示唆されるが、何れの場合も体重の差、若齢時の代謝速度の差も加味すれば相対的な排泄バランスが大きく変化したか明らかではない。呼気中排泄率については、幼若ラットで成熟ラットより高い傾向を示し、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> としてゆっくりした排泄がみられた。単炭素としてエネルギー代謝に取り込まれたのではなく、一部のアクリルアミドがタンパク質等の高分子に結合し、それが分解代謝されたためとも考えられた。

尿・糞・呼気中排泄率、生体内分布及び血中残留率等から、AA の吸収・分布・代謝・排泄が成熟ラットより幼若ラットで速いことが推定された。但し、分解して呼気中に排泄される長い過程におけるリスクの可能性も考慮しておく必要もあると思われる。全身オートラジオグラフィでは、幼若ラット及び成熟ラットの何れでも、血液中濃度は高く、次いで眼球、肝臓、肺、腎臓、皮膚、脾臓が高濃度臓器であったが、標的臓器と考えられる甲状腺ならびに乳腺で集積性は認められなかった。[2, 3-<sup>14</sup>C]AA 0.5-2.5mg/kg を経口投与後の授乳中ラットから乳仔ラットへの移行性を検討した結果、乳汁中放射能濃度は、投与

後30分でも低濃度存在し投与後6時間で最高値を示し、その後ゆっくり減少した。投与した[2,3-<sup>14</sup>C]AAの放射能は母親ラットの乳汁から乳仔へ低濃度移行した。投与して長時間経過後は、未変化体での移行は少ないと考えられるが、投与後短時間においては未変化体[2,3-<sup>14</sup>C]AAで乳汁に移行し、乳仔に吸収される可能性も考えられた。

## (2) ライフステージによるAAの神経毒性及び精巢毒性の病理解析 [渋谷]

幼若ラットでは100 ppm以上で体重増加抑制を示し、200 ppmで摂餌量および摂水量の減少が認められた。これらの減少は、幼若ラットは体のサイズが小さいため、神経症状出現後、通常ケージでは餌や水の摂取が困難となったことが原因と考えられた。また、臓器重量の変動は、体重増加抑制に起因すると考えられた。

投与期間中、幼若、成熟ラットともに100 ppm以上で同様の歩行異常を示し、幼若ラットの方が、歩行異常の出現時期および症状の進行が早い傾向が認められた。また、病理組織学的検索および形態計測では、両群とも100 ppm以上で神経障害を示す形態変化が明らかであり、高用量群では成熟ラットに比べ幼若ラットの方が神経障害の程度が強い傾向がみられた。体重当たりのAA摂取量は、成熟ラットに比べ幼若ラットの方が高く、歩行異常や変性軸索の割合などの神経毒性パラメーターがAA摂取量に応じた増加を示したことから、幼若期と成熟期のAAの神経毒性に対する感受性の差は乏しく、その障害の程度は体重当たりのAA摂取量に相関するものと考えられた。

精巢毒性については、成熟ラットでは過去の報告と同様に、100 ppm以上で性細胞の剥離が観察された。一方、幼若ラットでは、精子細胞を主体とした障害が顕著であった。成

熟動物に比べAA摂取量に対して著しく重度で多様な病変が観察されたことから、性成熟前後の動物は成熟期と比べてAAの精巢毒性に高い感受性を持つことが示唆された。AAはキネシン等のモーター蛋白を障害することが知られており、これが精子細胞の障害に関与した可能性が考えられる。しかし、本研究における遺伝毒性に関する検討で得られた結果も踏まえ、幼若期と成熟期における精巢毒性の感受性差については、さらに検討が必要である。

## (3) ライフステージによるAAの発がん感受性に関する研究 [今井]

AAの乳幼児期投与によるMNU誘発性発がんには及ぼす影響を検索する中期発がん性試験において、母動物では授乳期間中の80 ppm濃度でのAA投与により、体重、摂餌量及び摂水量が低値傾向を示し、児動物については、雌雄の全てのAA投与群において用量反応性を伴う体重の有意な低値がみられたが、その程度は最大約5%の増加抑制であり、摂餌量及び摂水量にはAA投与による明らかな変化は認められず、AAの摂取量あるいは諸臓器における発がん性の評価に著しく影響を及ぼすものではないと考えられた。雌雄のSDM投与群における甲状腺相対重量の高値は、SDMの抗甲状腺作用によるものと考えられた。肝臓、腎臓の相対重量の変化については用量反応性がなく、病理組織学的変化を伴っていないことからその意義は乏しいものと考えられた。

病理組織学的検索において、甲状腺では雌雄ともにSDMの投与により濾胞上皮の巣状過形成あるいは腺腫の発生頻度が増加したが、AA投与による明らかな影響はみられなかった。雄の0 ppm+SDM群における口腔の扁平上皮過形成の増加については、40 ppm+SDM群では対照群と差がみられなかったため、偶発的なものと考えられた。肺では雄のAA投与群

において肺胞上皮過形成の発生頻度の低下がみられたが用量反応性に乏しく、80 ppm群において肺腺癌の発生頻度が逆の変動を示し、肺腺腫と肺腺癌を合わせて評価した場合には群間に差が認められなかったことから、AAの肺発がんに及ぼす影響はないものと判断された。雄のSDM投与群では肺腺腫及び腺癌の発生頻度の増加がみられたか、その機序は明らかではなかった。雌の40 ppm+SDM群では対照群に比し巣状の子宮腺過形成の発生頻度が増加したが、0 ppm+SDM群との比較において有意差はみられず、AAによる影響とは判断されなかった。

#### (4) 生体内代謝機構を考慮した AA 遺伝毒性抑制物質の探索 [本間]

我々がこれまでに実施した *in vitro* の研究では、AA は殆ど毒性を示さなかったのに対し、GA の遺伝毒性は強く、主として点突然変異を主体とする DNA 損傷作用を持つことを報告した。このことから、AA の毒性の本体はその代謝物である GA であると結論した。AA は CYP2E1 により、エポキシ環をもつ GA に変換され、強い遺伝毒性物質に変わることが予想される。Manjanatha は BigBlue マウスを用いて AA 及び GA を 100 及び 500 ppm 濃度で 4 週間飲水投与し、肝臓における突然変異の検討を行い、ともに突然変異を有意に上昇させたが、AA でその誘発率が高いと報告している。また、突然変異スペクトルを比較したところ、AA も GA も GC>TA のトランスポージョンを主体とする点突然変異であることが示された。我々の今回の実験は、Manjanatha らの報告に基づいて行ったが、100、500 ppm での飲水投与は非常に毒性が強く、特に幼若ラットでの生存性に問題があると判断したため、20-200 ppm の低濃度領域で試験を行った。骨髄、末梢血において小核誘発は認められなかったが、Manjanatha らの報告でも 100 ppm では骨髄小

核の誘発は認められていない。我々の *gpt delta* ラットを用いた実験では、幼若ラットの末梢血及び骨髄においてのみ統計学的有意差が認められた。また、SD ラットでは両者で有意差が認められた。従って、造血系に対して AA は弱い遺伝毒性を示すが、幼若ラットで特に強い影響があるとは考えにくい。一方、肝臓ではコメット及び *gpt* 突然変異が試験された。一般にコメット試験は処理直後に試験を実施しないと DNA 修復が働くため、DNA 損傷の検出が困難であると言われているが、今回の実験で、飲水投与のような長期暴露による DNA 損傷も検出できることがわかった。*gpt* 突然変異に関しては全ての用量で無処理群と比較して突然変異の増加は観察されなかった。Manjanatha の報告でも 100 ppm では突然変異の誘発は顕著でなく、我々の 80 ppm では突然変異の誘発がないことはこのことを支持するものである。精巣に関しては、SD ラットの実験で、小核、コメットともに幼若ラットのみで用量依存的な増加が観察され、特に幼若ラットで顕著であった。*gpt* ラットでの突然変異検索でも 80 ppm 群において両者で突然変異の増加が観察された。また、この増加は幼若ラットのみで有意であった。これらの結果は、少なくとも精巣に関しては幼若ラットが AA の遺伝毒性に強い感受性を持つことを示している。

DNA 付加体の結果はこのことを裏付けるものである。精巣での N7-G-GA は幼若、成熟ラットともに用量依存的に増加し、特に幼若ラットでは 80 ppm で  $120/10^8$  bp の増加量であった。これはバックグランドレベルの 20 倍で成熟ラットの場合と比較しても 6 倍以上高い。これまで、精巣には AA の付加体が蓄積しやすく、その原因としてプロタミンとの結合が考えられている。また、その約 5% は DNA とも付加体を形成する。AA は精巣細胞に強い遺伝

毒性を示し、転座型の染色体異常を示すこと、低い濃度でも優性致死試験で陽性を示すことが知られている。このように AA は特に生殖細胞に遺伝毒性を示し、それが付加体の生成と相関するものと考えられる。さらに今回、我々の実験ではこの傾向が幼若ラットで顕著に現れることが示された。この原因については不明であり、今後の解明が待たれるが、少なくとも AA の生殖細胞に対する遺伝毒性感受性には年齢が関係しており、幼年期での AA の過剰摂取に関しては、注意が必要と考えられる。また、乳腺でも高い DNA 付加体が観察された。乳腺は AA の発がん標的組織の一つであり、今後、雌ラットでの検証も必要である。

#### E. 結論

(1) ライフステージによる AA の体内動態の特性 [紅林]

[2, 3-<sup>14</sup>C]AA は経口投与後速やかに小腸から吸収され門脈から血液に入り、全身組織へ廻り、代謝を経て大半は尿より速やかに排泄されることが明らかとなった。また、尿・糞・呼気中排泄率、生体内分布及び血中残留率等から、AA の吸収・分布・代謝・排泄が成熟ラットより幼若ラットで速いことが推定された。

(2) ライフステージによる AA の神経毒性及び精巣毒性の病理解析 [渋谷]

AA の神経毒性については、幼若期と成熟期の感受性差は乏しく、その障害の程度は体重当たりの AA 摂取量に相関するものと考えられた。一方、精巣毒性に関しては、幼若期の感受性が高いことが示された。

(3) ライフステージによる AA の発がん感受性に関する研究 [今井]

AA の乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん実験を行った結果、本実験条件下では AA のラット乳幼児期における投与は甲状腺及び乳腺をはじめとする AA の標的臓器を含

む各臓器、組織における前がん病変及び腫瘍性病変の発生に明らかな影響を及ぼさないことが示された。

(4) 生体内代謝機構を考慮した AA 遺伝毒性抑制物質の探索 [本間]

AA の各種遺伝毒性と、DNA 付加体形成に対する幼若及び成熟ラットの感受性差を検討した結果、多くの組織で違いが認められなかったのに対し、精巣では DNA 損傷の蓄積、小核の誘発、遺伝子突然変異の誘発が幼若ラットで顕著であった。また、それに対応した顕著な DNA 付加体量の増加も観察された。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takahashi, M., Shibutani, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Hirose, M., Nishikawa, A.: Pathological assessment of the nervous and male reproductive systems of rat offspring exposed maternally to acrylamide during the gestation and lactation periods - a preliminary study. *J. Toxicol. Sci.*, 33 (1), 11-24, 2008.

2) Takahashi, M., Shibutani, M., Nakahigashi, J., Sakaguchi, N., Inoue, K., Morikawa, T., Yoshida, M., Nishikawa, A.: Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods. *Arch. Toxicol.* (in press).

##### 2. 学会発表

1) 紅林秀雄、南部尚美、浜井憂子、重松昭世、今井俊夫、中澤憲一、大野泰雄：成熟雌性ラットにおける [2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 2.5mg/kg

経口投与後の体内動態. 第 35 回日本トキシコロジー学会年会 (2008. 6)

2) Kurebayashi, H., Nanbu, N., Hamai, Y., Shigematsu, A., Imai, T., Nakazawa, K., Ohno, Y.: Disposition of [2,3-<sup>14</sup>C]acrylamide orally dosed to juvenile and adult female rats. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (Baltimore, 2009. 3)

3) Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Shibutani, M., Nishikawa, A.: Susceptibilities to acrylamide-induced neurotoxicity and testicular toxicity between young and adult rats. 6th European Congress of Toxicologic Pathology (Edinburgh, 2008. 9)

4) 高見成昭、今井俊夫、曹永晚、広瀬雅雄、西川秋佳：アクリルアミドのラット乳幼児期投与による発がん感受性への影響. 第 67 回日本癌学会総会 (2008. 10)

5) Takami S., Imai T., Cho Y.M., Maeda M., Hirose M., Nishikawa A.: Effects of prepubertal exposure to acrylamide on N-methyl-N-nitrosourea induced multi-organ carcinogenesis in rats. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (Baltimore, 2009. 3)

6) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、今井俊夫、山本歩、汲田和歌子、増村健一、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充：ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第 37 回大会 (2008. 12)

8) Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., Nohmi, T.: Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide. 48<sup>th</sup>

Annual Meeting of the Society of Toxicology (Baltimore, 2009. 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
「食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究」  
(H18-食品一般-013)

分担研究報告書（平成20年度）

「ライフステージに対応したアクリルアミドの体内動態の特性」

低用量[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideを用いた放射性<sup>14</sup>Cトレーサー実験法によるアクリルアミドの雌性ラットにおける体内動態試験Ⅲ

研究分担者 紅林秀雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部

#### 研究要旨

- ・ 幼若および成獣雌性ラットを用い、低用量[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 0.5mg/kgでの経口投与後の体内動態を検討した。授乳中のラットに経口投与した[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideの乳汁移行性を確認した。
- ・ [2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideを0.5mg/kgで経口投与した雌性ラットの血液中放射能濃度は幼若ラットでは投与1時間後、成獣ラットは6時間後に最高数値に達し、その後72時間後でも高濃度を長時間保ち続けた。一方、血漿中放射能濃度は、投与後10～30分後に最高値を示し、6時間後には50%以下に72時間後には0.01-0.02μg eq/mLと速かに減少することから血液中の血球に残留することが示された。
- ・ 尿・糞・呼気中排泄率は、幼若ラットの投与72時間後までに尿中に69.3%、糞中に8.4%、呼気中に約7.5%の排泄が認められ、総回収率は85.2%であった。成獣ラットでは、投与後72時間までに尿中に63.0%、糞中に7.1%、呼気中に約3.1%の排泄が認められ、総回収率は73.2%であった。いずれも高い尿中排泄率があり吸収率の良いことが確認された。一方、成獣ラットに比べ幼若ラットで呼気中排泄ならびに総回収率がやや高い傾向が見られ、幼若ラットでAcrylamideの代謝・排泄が速い傾向にあると推定された。
- ・ 投与後72時間の全身オートラジオグラフィによる組織中放射能濃度は、高濃度順に、血液、腎臓、肝臓、眼球、肺、脾臓と血液が豊富な臓器で残留が認められた。一方、標的臓器と考えられる神経系細胞、甲状腺ならびに乳腺で特に高い集積性は認められなかった。
- ・ [2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideを投与後の授乳中ラットでの乳汁中放射能濃度は、投与後30分でも低濃度存在し、その後上昇し、投与後6時間で最高値に達した後は徐々に減少し、投与72時間後にはピーク時の約10%程度であった。投与した[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideの放射能は母親ラットの乳汁から乳仔へ低濃度移行することが確認された。



## A. 研究目的

アクリルアミドの食品からの推定摂取量は成人よりも小児の方が体重当りで高いとされている。一方、胎児期、乳幼児期あるいは春機発動期等の幼若期の毒性に対する感受性も危惧されるところである。

アクリルアミドの体内動態試験については MJ. Miller ら、AM. Kadry ら、又は K. Hashimoto らの精巣毒性が見られる雄性ラットを用いた文献が既に公表されている。前者の場合 1, 10, 100mg/kg の3投与量で血中について低濃度群が明瞭でなく、また組織内分布は主要臓器のみであり、ラット1匹当たりの全投与量に対する分配比に重点が置かれ、詳細な点に不明瞭なところも見られた。WJ. Waddel らのマウス全身マクロオートラジオグラフィのデータは組織・器官の特異分布を明瞭に示す成績を公開していたが、用量の差による分布、また幼若の場合の放射能濃度についての記述がなかった。

一般に動物の体内動態研究のデータとして雌性動物や小児期のものは少ない。そこで本実験で我々は、初年度は幼若雌性ラットに、また次年度は成熟雌性ラットに  $[2, 3-^{14}\text{C}]$ Acrylamide 2.5mg/kg を経口投与して、血液・血漿中、尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定、全身オートラジオグラフィおよび組織中放射能濃度測定を行った。これらと比較するため、本年度はより低用量の  $[2, 3-^{14}\text{C}]$ Acrylamide 0.5mg/kg を雌性ラットに経口投与して、血液・血漿中放射能濃度測定、尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定を行い、幼若ラットと成熟ラットでのアクリルアミドの体内動態の特徴とその用量による差異などを調べ幼若ラットへの

影響を考察する。

同時に乳児期での暴露が危惧されているため、授乳中ラットに  $[2, 3-^{14}\text{C}]$ Acrylamide を投与した時の乳汁移行性を検討し乳仔ラットへの影響を考察する。

実験系は簡便化と合理化とを試験資料の品質と制度を保持しつつ実施された。

使用動物の個体数の削減 (H18/6/1 厚労省課長通達)

高感度  $^{14}\text{C}$ 放射能検出法の活用

観察時点数の最小限化

の3項について留意した。

## 20年度研究計画 (方法)

### 2. 試験目的

幼若ラットおよび成獣ラットを用い、低用量  $[2, 3-^{14}\text{C}]$ Acrylamide 0.5mg/kg の経口投与を行い、 $[2, 3-^{14}\text{C}]$ Acrylamide の血液・血漿中、尿・糞・呼気中放射能濃度・放射能排泄率を測定し、 $[2, 3-^{14}\text{C}]$ Acrylamide 体内動態を明らかにする。また、授乳中の母親ラットに投与し、乳汁から乳仔へその放射能が移行する可能性を検討した。

### (参照文献)

- 1) Miller MJ, Carter DE, Sipes IG. Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 63:36-44(1982).
- 2) Hashimoto K and Aldridge WN. Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem Pharmacol* 19:2591-604(1970).
- 3) Kadry AM, Friedman MA, Abdel-Rahman MS. Pharmacokinetics of acrylamide after

oral administration in male rats.  
Environ Toxicol Pharmacol  
7:127-33(1999).

4) Marlowe C, Clark MJ, Mast RW, Friedman MA, Waddell WJ. The distribution of [<sup>14</sup>C] acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography. Toxicol Appl Pharmacol 86:457-65(1986).

(参考資料)

1) [2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide を用いた放射性 <sup>14</sup>C トレーサー実験法によるアクリルアミドの体内動態試験 (試験番号: IK-0601) - (株) 生体科学研究所内部資料

2) [2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide を用いた放射性 <sup>14</sup>C トレーサー実験法によるアクリルアミドの体内動態試験 - 成獣ラット (試験番号: IK-0701) - (株) 生体科学研究所内部資料

## B. 研究方法

### 1. 被験物質

#### 1.1 標識化合物

名称 : [2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide  
化学式 : CH<sub>2</sub>=CHCONH<sub>2</sub>  
供給者 : 室町薬品株式会社  
ロット番号 : ARC-081008  
性状 : 70%エタノール溶液 (無色透明)  
比放射能 : 5 mCi /mmol (185 MBq /mmol)  
濃度 : 0.1 mCi/mL  
放射化学的純度 : 99%  
入手日 : 2008年10月15日  
入手量 : 250 μCi (9.25 MBq)  
保存場所 : 被験物質保管庫 (-20°C)  
保存条件 : 冷凍 (-20°C)、遮光

取扱上の注意 : 特になし

#### 1.2 標識化合物の純度測定

[2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 放射化学的純度を確  
認するため、化合物受入れ時 (ロット番号  
081008) および試験開始時に TLC 法を用い  
て検定を行った。分析条件は下記のとおり  
とした。

<TLC 分析条件>

検定日 : 2008年10月15日 (化合物受入れ  
時)

2008年11月4日 (試験開始時)

TLC プレート : RP 18WF254

Mobile phase : 20% Methanol/DW

#### 1.3 投与液の調整

[2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide をメスフラスコ  
中に採取し、窒素気流下 (室温) でエタノ  
ールを留去したのち、蒸留水で溶解し、最  
終濃度が 35.2 μCi/0.5mg/2mL 水溶液を調  
製した。

調整日 : 2008年11月4日

#### 1.4 放射能濃度の確認

調整日に適量 (n=3) をサンプリングし、エ  
タノールで稀釈後に放射濃度を測定した。  
平均値が設定濃度の 90~110%の範囲内  
であることを確認した。

#### 1.5 試験動物

試験に供する SD 系統ラットは、日本チャー  
ルズリバー株式会社より購入した。1 ケー  
ジ当たり 5 匹以下で収容し、1 週間以上の  
予備飼育後、健康状態の良い動物を試験  
に使用した。予備飼育中および試験中にお  
ける動物の観察は被毛および皮膚、排泄物

などの一般状態とし、毎日行った。  
動物入荷時に、動物の尾に番号を付け識別した。試験に際しての群分けは無作為に行った。動物は金属製ケージ(340W x 460D x 230H mm、夏目製作所)に收容して飼育した。ケージ、床敷、給餌器および給水ビンの交換は3回/週行った。予備飼育中および試験中の飼育は、温度19.8~22.2℃、湿度47.0~52.0%RH、明暗サイクル12時間/12時間(明:6時~18時;暗:18時~翌6時)に設定した飼育室内で行い、飼料(ラット用CE2、株式会社日本クレア)および水は自由摂取とした。

#### 1.5.1 幼若ラット

購入時週齢 : 3週齢  
微生物レベル : SPF  
購入動物数 : 4匹  
投与開始時週齢 : 4週齢

#### 1.5.2 成獣ラット

購入時週齢 : 13週齢  
微生物レベル : SPF  
購入動物数 : 4匹  
投与開始時週齢 : 14週齢

#### 1.5.3 哺乳ラット(乳仔付き)

購入時週齢 : 13週齢(交配時週齢9週)  
微生物レベル : SPF  
購入動物数 : 2匹

動物の個別用途 : 幼若および、成獣ラットは経時血液採取目的で2匹、尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定で2匹ずつ用いた。乳仔ラットは(乳仔10匹/母獣)、乳汁中放

射能濃度測定で各観察時点につき2匹ずつ使用した。

#### 1.6 投与方法および投与量

投与経路 : 経口投与  
方法 : ステンレス製経口ゾンデを用い、胃内に強制投与した

投与量 : 35.2  $\mu$ Ci/0.5mg/kg BW

匹数 : 10匹(2匹 $\times$ 5群)

投与日 : 2008年11月4日

#### 1.7 血液・血漿中放射能濃度測定

投与後のラット(2匹)より所定の時間にヘパリン処理を施したシリンジにより心採血をし、60  $\mu$ Lの血液を採集した。そのうち20  $\mu$ Lを測定用バイアルに正確に分取し、シンチレーションカクテル(生体科学研究所)を加えて混合し測定用試料の調整を行った。残りの血液を遠心分離(4℃、3000rpm、15分)して血漿を調製し、20  $\mu$ Lを適量のシンチレーションカクテル(生体科学研究所)を加えて混合した。液体シンチレーションカウンター(LSC-1000、ALOKA)を用いて血液・血漿中の放射能を計測した。

#### 1.8 尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定

投与後の動物(2匹)を呼気回収装置のついたガラス製代謝ケージ(特注品)に收容し、所定区間毎の呼気を捕集すると同時に尿および糞を分別採取した。呼気中の二酸化炭素は捕集液(モノエタノールアミン、プロピレングリコール、メタノールを1:1:1の割合)に吸収させ、その一部を採集して放射能を測定した。尿(ケージ洗液を含む)および糞は均一化した後、その一部を正確に秤量し、放射能を計測した。尿・糞・呼気中放射能排泄率の結果は投与放射

能量に対する試料中放射能量の割合 (% of dose) を求め、その区間および累積値で表現した。

### 1.9 全身オートラジオグラフィ

[2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 0.5mg/kg 経口投与後 72 時間の幼若ラットおよび成獣ラットの全身オートラジオグラフィを行った。オートラジオグラフにおける BAS2000 の PSL 値から半定量的黒化度として測定し、可視的に高濃度、中濃度、低濃度レベルおよび極低濃度レベルの 4 段階に分けて評価した。

### 1.10 乳汁中放射能濃度測定

母獣ラット (2 匹) に被験物質を投与後、所定の観察時点で授乳中の乳仔ラットより胃内容物を採取した。乳仔ラットを安楽死させ、胃内容物を約 100 μL 採取し、放射能計測用試料とした。計測値から乳汁中放射能濃度を算出した。

### 2.1 試験結果の表現法

血液および血漿中放射能濃度は、<sup>14</sup>C で標識した化合物を動物体重当たり微量に投与し、体内にその化合物が経時的に分散した場合の体内分散度合いを器官、組織あたりで非破壊的に表現する方法が一般的に採用されている。

核種が <sup>14</sup>C であれば、<sup>14</sup>C の崩壊に伴う崩壊数の割合 (崩壊数/分) を dpm/分/組織 (mg) で表現する。

また、投与量/体重として表現する場合は、下記の F 値 (Factor 値) として表現すると分散度が一律に見えて、結果・考察に表現される。

Factor 値 = 100 ×

$$\frac{\text{組織中放射能濃度 (dpm)} \times \text{サンプル量 (g)}}{\text{投与放射能 (dpm)} / \text{体重 (g)}}$$

放射能濃度を指標として、未変化体換算した薬物換算濃度は以下の式で算出した。

$$\text{薬物換算濃度 } (\mu\text{g eq./mL}) = \frac{\text{試料中放射能濃度 (dpm/mL)} \times \text{投与放射能 (dpm)}}{\text{投与薬物量 } (\mu\text{g})}$$

尿糞呼気中放射能排泄率の結果は、定められた区間での各観察項目について排泄放射能の投与全放射能に対する割合 (%) を算出し、その累積値を表中に記載した。

### 2.2 試験実施施設:

株式会社 生体科学研究所

### C. 結果

#### 3.1 被験物質の純度測定

検定日 : 2008年10月15日

標識化合物受入れ時純度検定	
純度 (%)	平均 (%)
96.13	96.18
96.23	

検定日 : 2008年11月4日

投与液調整時純度検定	
純度 (%)	平均 (%)
96.21	95.65
95.00	
95.73	

#### 3.2 血液・血漿中放射能濃度

[2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 経口投与後幼若ラットの血液・血漿中放射能濃度を Table 1 および Fig. 1 に示した。